

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2024. 01. 004

DTT 在 D-二聚体假性增高病例中的应用*

乔莹利,李 涛,宋 迪,张 垒,许波实[△]

河南省人民医院/阜外华中心血管病医院检验科,河南郑州 450003

摘 要:**目的** 探讨二硫苏糖醇(DTT)对 19 例血浆 D-二聚体水平>纤维蛋白(原)降解产物(FDP)水平患者 D-二聚体异常结果的纠正情况。**方法** 选择 2022 年 1 月至 2023 年 3 月于该院就诊且首次出现血浆 D-二聚体水平>FDP 水平的 19 例患者标本作为试验组,分别采用稀释试验、比对试验确定是否为 D-二聚体假性增高。同时随机选取 20 例 FDP 与 D-二聚体比值为 2~5 的枸橼酸钠 1:9 抗凝血浆作为对照组,将试验组和对照组分别进行 DTT 纠正试验和盐水处理试验,并对相关数据进行分析。**结果** 随着稀释倍数的增加,19 例患者 D-二聚体水平呈下降趋势($P<0.05$),FDP 无显著性变化($P>0.05$)。更换系统检测,19 例均能纠正为 FDP 水平>D-二聚体水平。对照组经 DTT 处理后,与盐水处理比较,D-二聚体水平差异无统计学意义($P>0.05$)。试验组的 DTT 处理和盐水处理结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。15 例患者经 DTT 处理后,可纠正为 FDP 水平>D-二聚体水平,且 DTT 纠正后结果和比对系统结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 该研究中大部分 D-二聚体假性增高者经 DTT 预处理后可纠正,且纠正后结果与比对系统结果具有一致性。

关键词:D-二聚体; 假性增高; 干扰; 二硫苏糖醇; 纤维蛋白(原)降解产物
中图法分类号:R446.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2024)01-0016-04

Application of DTT in cases with D-dimer pseudo elevation*

QIAO Yingli, LI Tao, SONG Di, ZHANG Lei, XU Poshi[△]

Department of Clinical Laboratory, Henan Provincial People's Hospital/Fuwai Central China
Cardiovascular Diseases Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China

Abstract:**Objective** To investigate the situation of dithiothreitol (DTT) in correcting the D-dimer abnormal results in 19 patients with plasma D-dimer level > fibrin and fibrinogen degradation product (FDP) level.
Methods The specimens of 19 patients who firstly appeared plasma D-dimer level > FDP level visited in this hospital from January 2022 to March 2023 were collected as the experimental group, and were tested by dilution and comparison tests to determine whether being D-dimer pseudo elevation. Meanwhile, 20 cases of 1:9 sodium citrate anticoagulated plasma with FDP/D-dimer ratio of 2—5 were randomly selected as the control group, the DTT correction test and normal saline treatment test were performed on both the experimental group and control group, then the related data conducted the analysis. **Results** As the dilution multiple increase, the D-dimer levels in the 19 cases showed the decreasing trend ($P<0.05$), while FDP had no significant change ($P>0.05$). By changing the system detection, all 19 cases could be corrected as the FDP level > D-dimer level. After the DTT treatment in the control group, there was no statistically significant change in the D-dimer level compared to saline treatment ($P>0.05$). In the experimental group, there was statistically significant differences between the DTT treatment results and saline treatment results. After the DTT treatment, 15 cases were corrected as the FDP level > D-dimer level, moreover there was no statistical difference between the DTT corrected results and the comparison system results ($P>0.05$). **Conclusion** In this study, most individuals of the D-dimer pseudo elevation can be corrected after the DTT pretreatment, showing consistency between the corrected results and those of the comparison system.

Key words: D-dimer; pseudo elevation; interference; dithiothreitol; fibrin and fibrinogen degradation product

D-二聚体的基本结构是一个相对分子质量为 180×10^3 的片段,只包含两个 D 结构域,但交联的纤

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20200119, LHGJ20200081)。
作者简介:乔莹利,女,主管技师,主要从事血栓与止血方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: poshixu@zzu.edu.cn。
网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20231127.1939.006.html>(2023-12-04)

维蛋白(原)降解产物(FDP)的结构可以是高度复杂的,包括多个交联的 D 结构域和(或)原始纤维蛋白原分子的 E 结构域。理论上 FDP 水平应该高于 D-二聚体水平^[1-3]。近年来,血浆 D-二聚体水平>FDP 水平的情况偶有报道,多为 D-二聚体假性增高^[4-7]。D-二聚体假性增高的原因多为免疫干扰引起的检测误差,临床常用于纠正免疫干扰的方法有稀释试验、更换检测系统、异嗜性抗体阻断剂(HBR)处理等^[7-9]。二硫苏糖醇(DTT)能用于蛋白质中分子内或分子间二硫键的还原^[10],且不会影响 D-二聚体之间的连接,因此,DTT 有望用于纠正 D-二聚体的假性升高,但目前尚缺乏文献报道。本研究对 DTT 纠正 D-二聚体假性增高的效果进行了探讨,共收集了 19 例临床检测工作中 D-二聚体水平>FDP 水平的标本及患者临床资料,并对标本进行多倍稀释、比对试验、DTT 纠正试验,旨在探讨 DTT 对 D-二聚体异常结果的纠正情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2022 年 1 月至 2023 年 3 月首次检测血浆 D-二聚体水平>FDP 水平的门诊及住院患者(19 例)同期血清和血浆标本(试验组)及临床资料,患者年龄、性别、疾病类型等分布如表 1 所示。本研究已征得所有研究对象的知情同意并通过医院伦理委员会审核。

表 1 19 例血浆 D-二聚体水平>FDP 水平的患者基线资料

项目		<i>n</i>	构成比(%)
性别	男	8	42.11
	女	11	57.89
年龄(岁)	<45	2	10.53
	45~<60	7	36.84
	≥60	10	52.63
疾病类型*	心血管疾病	15	78.95
	糖尿病	8	42.11
	肿瘤	2	10.53
	自身免疫疾病	2	10.53
	感染	4	21.05
类风湿因子	阳性	6	31.58
	正常	13	68.42

注:* 一个患者可能存在多个疾病诊断。

1.2 仪器与试剂 本实验室检测系统为日本 Sysmex 公司的 CS5100 全自动凝血分析仪,试剂为德国 Siemens 公司的 INNOVANCE D-二聚体试剂盒、日本 Sysmex 公司的 Latex Test BL-2 P-FDP 试剂盒。比对试验的仪器为日本积水公司的全自动凝血分析仪 SEKISUI CP 2000,试剂为配套的 Nanopia D-二聚体和 Nanopia P-FDP 试剂盒;其他试剂为 DTT(德国 Biofroxx 公司)。

1.3 方法 发现 D-二聚体水平>FDP 水平后,在征得患者的知情同意后,当日或次日空腹采集患者枸橼酸钠 1:9 抗凝血 3 mL,3 500 r/min 离心 10 min,分离乏血小板血浆,立即进行多倍稀释试验,剩余血浆分装后于-80 ℃冰箱内保存用于比对试验、DTT 纠正试验。随机选取 20 例 FDP 与 D-二聚体比值为 2~5 的枸橼酸钠抗凝血浆作为对照组。所有标本均无溶血、乳糜及黄疸,类风湿因子均低于试剂说明书声明的抗干扰水平。

1.3.1 稀释试验 使用与初始检测时相同的方法和仪器,将收集到的 D-二聚体水平>FDP 水平的 19 例患者的血浆采用仪器稀释模式分别对 D-二聚体(1/8、1/16、1/32)与 FDP(1/2、1/4)做稀释检测,然后将其稀释后的结果分别与初始结果进行比较。对于 D-二聚体原倍检测超出仪器线性范围或抗原过量的标本,以 8 倍稀释结果作为初始结果。

1.3.2 比对试验 在正常质量控制条件下,将收集的 D-二聚体水平>FDP 水平血浆标本用另一种仪器、试剂和检测方法(SEKISUI CP 2000, Nanopia D-二聚体与 P-FDP 试剂盒,乳胶免疫比浊法)检测 D-二聚体和 FDP 水平,并严格按照说明书操作。由于比对试验 D-二聚体的单位和参考范围与初始测量系统不一致,因此,使用 D-二聚体值与参考范围上限的比值进行初始检测系统和比对检测系统的比较。

1.3.3 DTT 纠正试验 将患者标本和 50 mmol/L 的 DTT 溶液等比例混合,将室温放置反应 30 min 后上机检测的 D-二聚体结果乘以 2 倍作为 DTT 处理结果。同期,将试验标本与生理盐水等比例混合,以室温放置 30 min 后上机检测的 D-二聚体结果的 2 倍为盐水处理结果。20 例对照组血浆标本同样按上述步骤处理。比较试验组和对照组中 DTT 处理的回收率。

1.3.4 试验组 DTT 处理后可纠正的结果与比对检测系统的结果比较 将试验组中经 DTT 处理可纠正的 D-二聚体结果与比对检测系统的 D-二聚体结果比较,由于比对检测系统 D-二聚体的单位和参考范围与初始测量系统不一致,因此,使用 DDT 纠正后 D-二聚体值与参考范围上限的比值和比对检测系统的 D-二聚体值与参考范围上限的比值比较。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理和统计分析。呈正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,呈非正态分布的计量资料用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稀释试验结果 稀释试验结果显示,19 例中有

8 例可通过多倍稀释纠正为 FDP 水平>D-二聚体水平。D-二聚体的 1/8 稀释结果[5.03(1.79~22.35)mg/L FEU]与初始结果[4.03(3.06~22.35)mg/L FEU]比较,差异无统计学意义($P=0.515$)。D-二聚体的 1/16 稀释结果[3.69(1.84~10.59)mg/L FEU]和 1/32 稀释结果[2.88(2.01~8.74)mg/L FEU]与初始结果[4.03(3.00~22.35)mg/L FEU]比较,差异有统计学意义(P 值分别为 0.001、<0.001)。FDP 的 1/2 和 1/4 稀释结果[2.50(2.50~2.50) $\mu\text{g/mL}$ 和 2.50(2.50~2.71) $\mu\text{g/mL}$]与初始结果[2.50(2.50~2.50) $\mu\text{g/mL}$]比较,差异无统计学意义(P 值分别为 0.285 和 0.059)。

2.2 比对试验结果比较 更换另一种检测系统(SEKISUI CP 2000)进行检测,19 例均符合 FDP 水平>D-二聚体水平。初始检测系统和比对检测系统 D-二聚体值与参考范围上限的比值比较,差异有统计学意义($P<0.001$)。初始检测系统和比对检测系统

FDP 结果比较,差异无统计学意义($P=0.088$)。见表 2。

表 2 比对试验结果[$M(P_{25} \sim P_{75})$]			
项目	初始检测系统	比对检测系统	P
D-二聚体值与参考范围上限的比值	9.22(5.62~40.64)	0.85(0.53~1.27)	<0.001
FDP($\mu\text{g/mL}$)	2.50(2.50~2.50)	2.00(1.60~2.90)	0.088

2.3 DTT 纠正试验 19 例患者经 DTT 处理后,有 15 例可纠正为 FDP 水平>D-二聚体水平,有 4 例不能纠正。对照组经盐水或 DTT 处理后的 D-二聚体水平比较,差异无统计学意义($P=0.702$)。试验组的 DTT 处理的回收率显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$)。试验组的 DTT 处理结果和盐水处理结果比较,差异有统计学意义($P<0.001$),试验组的盐水处理和初始结果比较,差异无统计学意义($P=0.445$)。见表 3。

表 3 试验组和对照组 D-二聚体经 DTT 和盐水处理结果比较[$M(P_{25} \sim P_{75})$ 或 $\bar{x} \pm s$]

组别	n	初始结果(mg/L FEU)	盐水处理		DTT 处理	
			结果(mg/L FEU)	回收率(%)	结果(mg/L FEU)	回收率(%)
对照组	20	5.16(3.74~8.94)	5.30(4.55~9.27)	103.64 $\pm$ 3.18	5.23(3.91~8.73)	95.95(94.10~99.05)
试验组	19	5.07(3.09~22.35)	4.72(3.46~29.72)	106.30 $\pm$ 26.26	0.60(0.28~1.56)	9.86(6.21~30.85)

2.4 15 例患者 DDT 纠正后结果和比对检测系统的结果比较 15 例患者 DDT 纠正后 D-二聚体值与参考范围上限的比值[0.91(0.47~1.67)]和比对检测系统的 D-二聚体值与参考范围上限的比值(0.84 $\pm$ 0.42)比较,差异无统计学意义($P=0.147$)。

3 讨论

本研究收集的 19 例 D-二聚体水平>FDP 水平患者的临床资料显示:女性 11 例(57.89%),45 岁以上有 17 例(89.47%),提示该现象男女均可出现,以中老年患者居多。稀释试验的结果显示,随着稀释倍数的增加,D-二聚体水平呈下降趋势,FDP 无显著性变化,多数病例经稀释后不能纠正为 FDP 水平>D-二聚体水平。比对试验结果显示,19 例初始系统 D-二聚体水平>FDP 水平的血浆标本,更换系统检测后均能纠正为 FDP 水平>D-二聚体水平,且两个系统 FDP 结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。这说明干扰物质影响了初始检测系统 D-二聚体的测定,但对更换后的系统没有影响。稀释试验和比对试验的结果均提示,本研究中的 19 例 D-二聚体水平>FDP 水平的患者均为 D-二聚体假性增高。

D-二聚体在某些情况下可作为激活凝血和促进纤维蛋白溶解有价值的标志物,间接反映机体处于高

凝状态和继发性纤溶亢进^[2-3]。D-二聚体具有较高的阴性预测价值,因此,D-二聚体广泛应用于活动性深静脉血栓形成(DVT)和肺栓塞(PE)的排除诊断。此外,D-二聚体还被用于确定静脉血栓栓塞症(VTE)患者的最佳抗凝时间、诊断和监测弥散性血管内凝血(DIC)、鉴别诊断原发与继发性纤溶亢进、监测溶栓治疗效果,以及监测患者处于出血或血栓形成高风险等其他情况^[2-3,11-13]。目前商业化的 D-二聚体免疫测定针对的是交联纤维蛋白降解片段 D 域表位,D-二聚体抗体的性质决定了其单克隆抗体或多克隆抗体的多样性^[14]。因此,在临床检测过程中 D-二聚体的检测易受到干扰物质的影响而出现 D-二聚体水平>FDP 水平的情况。由于错误的结果可能会导致临床对疾病的误诊、甚至错误的治疗,因此,纠正干扰得到真实的 D-二聚体结果就显得尤为重要。

DTT 常常被用于蛋白质中二硫键的还原,可用于阻断蛋白质中的半胱氨酸之间所形成的蛋白质分子内或分子间二硫键^[10],而不会影响 D-二聚体之间的连接。在血型鉴定试验中常使用 DTT 破坏 IgM 抗体的二硫键,降低 IgM 分子的多价性,从而降低其效价,使其失去直接凝集红细胞的能力,从而消除 IgM

类自身抗体对血型鉴定结果的影响^[15]。在 DNA 提取实验中常常添加 DTT 打断蛋白质之间的二硫键,使 DNA 充分游离,提高 DNA 的提取效率^[6]。造成 D-二聚体假性增高的干扰物质有类风湿因子、异嗜性抗体、大分子免疫球蛋白、人抗动物抗体、自身抗体、其他蛋白等^[4,7-9,16-20],临床常用于减少干扰的方法有稀释法、更换检测系统、HBR 处理等^[7-9]。DTT 在纠正 D-二聚体检测干扰中的作用尚不明确,本研究对 DTT 纠正 D-二聚体检测干扰的效果进行了初步探索。DTT 纠正试验结果显示,对照组经 DTT 处理与盐水处理后的 D-二聚体水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明 DTT 处理不影响常规 D-二聚体检测。试验组经 DTT 处理和盐水处理的 D-二聚体水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 DTT 处理可显著减少 D-二聚体的检测干扰。在本研究的 19 例患者中,15 例患者经 DTT 处理后,可纠正为 FDP 水平 $>$ D-二聚体水平,且 DTT 处理后 D-二聚体结果和比对检测系统的血浆 D-二聚体结果差异无统计学意义($P>0.05$),提示 DTT 纠正后的结果可靠,可用于临床诊疗。

综上所述,本研究中的 19 例患者均为 D-二聚体假性增高,其中 15 例检测前经 DTT 预处理后可纠正,纠正后的结果与更换另一种系统的结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明 DTT 可纠正大多数 D-二聚体假性增高的干扰。该试验具有操作方便(室温 30 min)、价格低廉(1 g DTT 不到 50 元人民币)、不需要额外的检测系统,可在基层医院常规使用,有望成为纠正 D-二聚体假性增高的一种新方法。本研究的不足之处是样本量较少,且仍有 4 例(21.05%)不能采用 DTT 预处理纠正干扰,这需要进行进一步扩大样本量,查找干扰原因,阐明干扰物质的类型,探究更具有针对性的纠正方式。

参考文献

- [1] TALON L,FOURNEYRON V,TRAPANI A,et al. Analytical performance of a new immunoturbidimetric D-dimer assay and comparison with available assays[J]. Res Pract Thromb Haemost,2022,6(1):e12660.
- [2] JOHNSON E D,SCHELL J C,RODGERS G M. The D-dimer assay[J]. Am J Hematol,2019,94(7):833-839.
- [3] 中国研究型医院学会血栓与止血专业委员会. D-二聚体实验室检测与临床应用中国专家共识[J]. 中华医学杂志,2023,103(35):2743-2756.
- [4] WU Y,XIAO Y X,HUANG T Y,et al. What makes D-

- dimer assays suspicious-heterophilic antibodies[J]. J Clin Lab Anal,2019,33(2):e22687.
- [5] 李勤,卢兴兵,石佳,等. 1 例 D-二聚体远高于 FDP 原因分析[J]. 标记免疫分析与临床,2021,28(1):179-180.
- [6] 杨益锋,曾丹,李娟,等. 两例 D-二聚体假性降低案例分析[J]. 检验医学与临床,2020,17(18):2747-2749.
- [7] 杨宏伟,樊一算. 免疫比浊法测定 D-二聚体假阳性病例干扰分析[J]. 临床检验杂志,2022,40(5):361-363.
- [8] 颜楠,刁艳君,韩峰,等. 凝血相关检测常见干扰因素分析与探讨[J]. 临床血液学杂志,2023,36(10):693-696.
- [9] 蒋利君,黎宇,戴盛明. 异嗜性抗体对免疫测定干扰的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2010,2(1):68-72.
- [10] 罗宁,刘平怀,吴晓娜,等. 高效液相色谱法测定药品中的二硫苏糖醇和氧化型二硫苏糖醇[J]. 分析科学学报,2016,32(4):537-540.
- [11] LIPPI G,MULLIER F,FAVALORO E J. D-dimer: old dogmas, new (COVID-19) tricks[J]. Clin Chem Lab Med,2022,61(5):841-850.
- [12] LINKINS L A,TAKACH L S. Review of D-dimer testing: good, bad, and ugly[J]. Int J Lab Hematol,2017,39(Suppl 1):98-103.
- [13] 雷孝波,王秀杰. D-二聚体检测及其临床应用进展[J]. 医学综述,2020,26(22):4521-4527.
- [14] FAVRESSE J,LIPPI G,ROY P M,et al. D-dimer: preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications[J]. Crit Rev Clin Lab Sci,2018,55(8):548-577.
- [15] 史景莉,马会敏,闫慧,等. 二硫苏糖醇在较高价冷抗体导致疑难血型鉴定中的应用[J]. 医药论坛杂志,2021,42(3):41-44.
- [16] ZHANG X Y,ZHANG X X,XU J L,et al. Identification of and solution for false D-dimer results[J]. J Clin Lab Anal,2020,34(6):e23216.
- [17] 王宏丽,曾甲子. 免疫比浊法测定 D-二聚体假阳性结果的甄别与处理方法[J]. 标记免疫分析与临床,2020,27(5):870-873.
- [18] 颜楠,韩峰,刘家云. 关于 D-二聚体检测中假阳性与假阴性问题的探讨[J]. 检验医学与临床,2021,18(16):2424-2427.
- [19] ROBIER C,EDLER E,KLESCHER D,et al. False-positive D-dimer result in a latex-enhanced immunoassay caused by interfering human anti-mouse antibodies[J]. Clin Chem Lab Med,2014,52(11):e253-e255.
- [20] 许强,王锡鸣,于东泽,等. 30 例 D-二聚体假性增高的数据分析[J]. 标记免疫分析与临床,2020,27(1):1-5.